管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌多样性研究

张镇梁[1,2]，王美娜[2]，李健[2]，李素珍[2]，段晓娟[2]，乔琦[1*]

（1. 河南科技大学 农学院/牡丹学院，河南 洛阳 471023；2. 深圳市兰科植物保护研究中心（全国兰科植物种质资源保护中心），深圳市濒危兰科植物保护与利用重点实验室，兰科植物保护与利用国家林业与草原局重点实验室，广东 深圳 518114）

摘要：管叶槽舌兰（*Holcoglossum kimballianum*）是一种珍稀濒危的兰科植物，野生种群亟需保护。内生菌对兰科植物的生长发育至关重要，为评估管叶槽舌兰内生菌的多样性及采样方式对其内生菌的影响，该文采用高通量测序技术对迁地保育状态下新鲜与硅胶干燥的管叶槽舌兰根内生菌进行了研究。结果表明：（1）新鲜及干燥管叶槽舌兰根内生菌物种组成明显不同，管叶槽舌兰内生真菌注释到 6 门 46 科 51 属，内生细菌注释到 15 门 105 科 178 属；干燥后管叶槽舌兰根内生真菌注释到 6 门 88 科 116 属，内生细菌注释到 21 门 154 科 336 属。（2）迁地保育状态的管叶槽舌兰根样内生菌具有丰富的多样性，且内生细菌群落丰富度和多样性远比内生真菌群落高；经硅胶干燥后，内生真菌α多样性指数升高，β多样性降低，而内生细菌的α多样性指数降低，β多样性则升高。（3）差异显著性真菌黄盖小脆柄菇（*Psathyrella candolleana*）和刺盘孢属（*Colletotrichum*）的 *C. tofieldiae* 只存在于新鲜根样中，新鲜管叶槽舌兰差异显著性细菌是马赛菌属（*Massilia*），干燥根样中差异显著性细菌类群包括拜叶林克氏菌科（Beijerinckiaceae）、黄色杆菌科（Xanthobacteraceae）及慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）。（4）共发生网络分析表明经干燥后管叶槽舌兰根样的内生菌群落中占互作主导地位的优势物种和互作模式都发生了改变。综上所述，不同的采样处理会影响管叶槽舌兰根内生菌的群落结构，在研究兰科植物根样内生菌时宜使用新鲜的根样。该研究结果可为管叶槽舌兰野生种群保护及人工栽培提供内生菌数据基础，同时，也可为兰科植物内生微生物采样方法提供参考。

关键词：管叶槽舌兰，内生真菌，内生细菌，新鲜，硅胶干燥，多样性

中图分类号：Q93-33　　　　　　**文献标识码：**A

Study on endophytic communities diversity of fresh and silica gel-dried root samples of *Holcoglossum kimballianum* (Orchidaceae)

ZHANG Zhenliang[1,2], WANG Meina[2], LI Jian[2], LI Suzhen[2], DUAN Xiaojuan[2], QIAO Qi[1*]

(1. *Agricultural College/Peony College, Henan University of Science and Technology*, Luoyang, 471023, Henan, China; 2. *Orchid Conservation & Research Center of Shenzhen and the National Orchid Conservation Center of China, Shenzhen Key Laboratory for Orchid Conservation and*

基金项目：国家自然科学基金（32001245）；深圳市可持续发展专项（KCXFZ20211020164200001）深圳市科技计划项目（JCYJ20210324123013037）[Supported by National Natural Science Foundation of China (32001245); Shenzhen Sustainable Development Technology Project (KCXFZ20211020164200001); Science and Technology Plan Project of Shenzhen (JCYJ20210324123013037)]。

第一作者：张镇梁（1997-），硕士研究生，研究方向为植物保护，（E-mail）2399308611@qq.com。

通信作者：乔琦（1971-），博士，副教授，研究方向为植物保护生物学，（E-mail) nxyqiao@163.com。

Utilization, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, Shenzhen, 518114, Guangdong, China)

Abstract： *Holcoglossum kimballianum* is a rare and endangered orchid, which wild populations are in urgent need of conservation. Endophytic fungi and bacteria are important to the growth and development of orchids. In order to assess the diversity of *H. kimballianum* endophytes and the impact of sampling methods on the endophytes, high-throughput sequencing technology was used to study the diversity of endophytes in fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum* in *ex-situ* conservation. The results were as follows: (1) The species compositions of endophytic fungi and endophytic bacteria were distinctly different in fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum*. There were total of 6 phyla 46 families 51 genera of endophytic fungi and 15 phyla 105 families 178 genera of endophytic bacteria annotated in the roots of the *H. kimballianum*. After silica gel-dried, the endophytic fungi of the *H. kimballianum* had total of 6 phyla, 88 families, 116 genera, and the endophytic bacteria had total of 21 phyla, 154 families, 336 genera. (2) Endophytes in the roots of *H. kimballianum* in *ex-situ* conservation were of rich diversity, and the endophytic bacteria diversity was much higher than the endophytic fungi diversity. After silica gel-dried, the α diversity indices of endophytic fungi increased and the β diversity indices decreased, while the α diversity indices of endophytic bacteria decreased and the β diversity indices increased. (3) Significantly different fungi *Psathyrella candolleana* and *Colletotrichum tofieldiae* only existed in the endophytic fungal communities of fresh roots. The significantly different bacteria in roots of fresh *H. kimballianum* was *Marseilla*, and the significantly different bacteria in the silica gel-dried roots included Beijerinckiaceae, Xanthobacteraceae and *Bradyrhizobium*. (4) Co-occurrence network analysis revealed that the dominant species and interaction patterns in the endophytic communities of the roots of *H. kimballianum* were changed after silica gel-dried. In summary, different sampling treatments can affect the community structure of the endophytes in the roots of *H. kimballianum*, and it is advisable to use fresh root samples when studying the endophytes of orchids. The results can provide an endophytic data basis for wild populations conservation and artificial cultivation of *H. kimballianum*, and also provide a reference for sampling methods of endophytic microorganisms in orchids.

Key Words: *Holcoglossum kimballianum*, endophytic fungi, endophytic bacteria, fresh, silica gel-dried, diversity

生态系统中，植物与大量微生物相互作用，这些微生物在地下和地上植物器官的内部和外表面都有定殖（Compant et al., 2019；Escudero et al., 2019），这些与植物相关的微生物群落统称为植物微生物群（Marchesi et al., 2015），细菌和真菌是植物微生物群的主要组成部分，它们对植物微生态系统的平衡起到重要的作用。植物中的内生菌是指其生活史的一定阶段或全部阶段，生活于健康植物中的各种组织和器官的细胞间隙或细胞内的菌类。内生真菌对兰科植物非常重要，兰科菌根真菌即属于内生真菌，它们是兰科植物的生长发育各个阶段不可或缺的关键因素，能够直接参与兰科植物根系甚至整个植株的生理代谢活动，保障兰科植物的生长、个体间的竞争以及对病原体的防御（盖雪鸽等，2014；Mccormick et al., 2018；Li et al., 2021）。高越等（2019）从手参（*Gymnadenia conopsea*）根系中分离出角担菌属（*Ceratobasidium*），将该菌株与手参种子进行共培养，发现它能明显促进手参种子原球茎的形成并最终分化成幼苗。杨文科（2020）通过迁地共生萌发从白旗兜兰（*Paphiopedilum spicerianum*）原球茎中分离出胶膜菌属（*Tulasnella*），它能有效促进其种子萌发直到幼苗

阶段。这些研究结果都表明内生真菌在兰科植物的生长发育中有着极大的促进作用。据不完全统计，已报道的常见兰科植物菌根真菌有 69 属，分别隶属于担子菌门（Basidiomycota）、子囊菌门（Ascomycota）及毛霉门（Mucoromycota）的 50 科中（陈艳红等，2017；王美娜等，2021）。

兰科植物的内生菌中还存在大量有益的内生细菌，这些有益的内生细菌对兰科植物的生长发育也发挥着积极的促进作用，研究表明内生细菌能够促进兰科植物种子萌发、光合形态建成、缓解非生物胁迫及生长发育等（Tsavkelove et al., 2007）。目前，关于兰科植物根部细菌结构和功能的认知还非常有限（Kaur et al., 2021 ）。在兰科植物中分离出来的细菌通常属于变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）和厚壁菌门（Firmicutes），不同的菌根细菌类群对兰科植物具有不同程度的促进作用，Faria 等（2013）研究发现，类芽孢杆菌属（*Paemibacillus*）能促进 *Cattleya loddigesii* 幼苗的生长。从兰属（*Cymbidium* sp.）的根中分离出的根瘤菌属（*Rhizobium*）能溶解磷酸钙。此外，有研究表明，兰科植物菌根中存在菌根辅助细菌(Mycorrhiza helper bacteria)（Tarkka et al., 2008），能与菌根真菌特异性结合，刺激菌根真菌的孢子萌发和菌丝生长，促进菌根真菌在宿主植物中定殖和生长，加强菌根化，从而促进植物生长及增强抗逆性（陈耀丽等，2019；Wang et al., 2021；Rahayu et al., 2021）。因此，加强兰科植物内生细菌的研究，在兰科植物的相关微生物研究中显得非常重要。

管叶槽舌兰（*Holcoglossum kimballianum*）隶属于兰亚科（Subfamily Orchidoideae）万代兰族（Tribe Vandeae）槽舌兰属（*Holcoglossum*），分布在中国云南、缅甸、泰国，常附生在山地林中的树干上，海拔一般在 1 000 m 以上，具有较高的观赏价值，濒危等级为 EN（濒危），其野生种群亟需保护。目前对管叶槽舌兰的研究主要集中在系统发育、生物地理学和细胞学等方面，对其根部内生菌的研究鲜有报道。另外，有些研究人员针对植物内生微生物的研究在采样时为方便野外作业经常采用硅胶干燥的方法（Harrison et al., 2016），这有可能会引起根内微生物群落的极大变化，因此，本研究采用 ITS 和 16S 高通量测序技术方法，通过对管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样中的内生真菌和内生细菌群落进行研究，拟探讨以下问题：（1）管叶槽舌兰根样内生菌类群的多样性。（2）管叶槽舌兰新鲜根样与干燥根样中内生菌群落的差异。（3）管叶槽舌兰根样内生细菌和真菌的比较。以期为管叶槽舌兰的种植及种质资源保护提供内生真菌和细菌方面的数据，为研究兰科植物根内微生物提供采样处理的依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集及预处理

在深圳市兰科植物保护研究中心，采集迁地保护状态下的管叶槽舌兰生长健康的根，在不影响管叶槽舌兰正常生长的情况下，每个样品取 3~5 条长 2~5 cm 的根段，尽量由三株以上的管叶槽舌兰根样组成，采集的同一组根样分别做新鲜及干燥根样的预处理。新鲜根样预处理在根段取材后即刻进行，步骤如下：用流水冲洗根表面后，用 5%次氯酸钠和 75%酒精依次消毒 2 min，加入无菌水，洗净弃废液；将预处理后得到的最后一次无菌水进行 DNA 提取和风险建库测试，未得到任何结果，表明样品得到了很好的预处理。新鲜根样置于-80℃冰箱以备提取微生物组 DNA。干燥根样在预处理后放入硅胶中干燥 72 h 备用。每个处理重复 8 次。

1.2 根内微生物组 DNA 提取、PCR 扩增、文库构建及 HiSeq 测序

使用 QIAGEN PowerLyzer 试剂盒对根内微生物组 DNA 进行提取。PCR 扩增内生真菌选择带 Barcode 的特异引物（ITS5-1737F：GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG）和（ITS2-2043R：GCTGCGTTCTTCATCGATGC），内生细菌选择带 Barcode 的特异引物（fM1：

CCGCGTGNRBGAHGAAGGYYYT；rC5：TAATCCTGTTTGCTCCCCAC）进行 PCR 扩增（Bellemain et al., 2010；Yu et al., 2013）。反应程序如下：98 ℃预变性 1 min；然后进入 30 个扩增循环（98 ℃，10 s；50 ℃（真菌）、55 ℃（细菌），30 s；72 ℃，30 s）；最后 72 ℃延伸 5 min。反应体系（30 μL）为：2 × Phusion Master Mix（New England Biolabs）15 μL，Primer（2 μM）3 μL，gDNA 10 ng，补充 H_2O 至 30 μL。使用 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测，PCR 产物胶回收纯化后使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建，利用 Illumina HiSeq 2500 PE 250 平台进行测序（北京诺禾致源生物科技有限公司）。

1.3 数据分析方法

测序数据截去 Barcode 和引物序列后，使用 FLASH（Version 1.2.7）（Magoč & Salzberg, 2011）进行拼接，得到 Raw Tags 后使用 fastp 软件对 Raw Tags 进行过滤（Bokulich et al., 2013）得到高质量的 Clean Tags。参照 Qiime（V1.9.1）的 Tags 质量控制流程和去除嵌合体处理后（Caporaso et al., 2010）得到有效数据 Effective Tags。利用 Uparse 软件（V 7.0.1001）（Edgar et al., 2013）以 97%的一致性对所有样品的全部 Effective Tags 进行聚类得到 OTUs，对出现频数最高的 OTUs 代表序列采用 Qiime 软件（V 1.9.1）中的 Blast（Altschul et al., 1990）和 Mothur（Schloss et al., 2009）方法与真菌数据库 Unite（Kõljalg et al., 2013）和细菌数据库 Silva（Yilmaz et al., 2014）进行物种注释分析，统计各样本的群落组成。以样本中数据量最少的为标准进行均一化处理后，基于 Qiime 软件计算α多样性指数及β多样性指数，并进行 *T*-test 差异显著性检验。利用 R 软件的 VennDiagram 包和 Vegan 包进行维恩图及无度量多维标定法（non-metric multi-dimensional scaling，NMDS）分析。为进一步挖掘分组样本间的差异显著性真菌和细菌类群，选用 Metastat、LEfSe 统计分析方法对分组样本的物种组成和群落结构进行差异显著性检验（White et al., 2009；Segata et al., 2011）。对所有样品的相关性指数（斯皮尔曼相关系数 SCC）进行计算后，用 cutoff＝0.6 对相关系数的绝对值进行过滤，结合物种丰度构建共发生网络（Network）图（Qin et al., 2012）。

2 结果与分析

基于 Illumina HiSeq 测序技术，16 个管叶槽舌兰根部 ITS 共获得 2 834 046 条有效 tags，有效 tags 范围为 164 665~187 236。管叶槽舌兰根部 16S 共获得 2 397 083 条有效数据，有效 tags 范围为 128 514~161 972。

2.1 内生菌群落物种组成及采样处理对其影响的分析

注释结果发现，新鲜管叶槽舌兰注释到的根内生真菌有 6 门 46 科 51 属，其中子囊菌门相对丰度 52.20%，担子菌门相对丰度 20.22%，球囊菌门（Glomeromycota）、罗兹菌门（Rozellomycota）、被孢霉门（Mortierellomycota）、毛霉门相对丰度只有 1%左右；而经硅胶干燥后的管叶槽舌兰注释到的根内生真菌有 6 门 88 科 116 属，其中子囊菌门相对丰度 57.84%，担子菌门相对丰度 3.68%，球囊菌门、被孢霉门、毛霉门、罗兹菌门的相对丰度在 1%以下。在两个分组中，子囊菌门都占绝对的优势。相比较而言，干燥后管叶槽舌兰根样内生真菌类群数量变多；新鲜管叶槽舌兰根样内生真菌群落中子囊菌门、球囊菌门占比低于硅胶干燥根样中的内生真菌群落，而兰科菌根真菌最多的担子菌门明显高于硅胶干燥根样中的内生真菌群落（图 1：a）。经硅胶干燥后，管叶槽舌兰根内生真菌在科水平（图 1：b）的相对丰度也发生了改变，曲霉科（Aspergillaceae）在干燥后丰度明显降低，而枝孢霉科（Cladosporiaceae）在干燥后丰度明显升高，小丛壳科（Glomerellaceae）和胶膜菌科（Tulasnellaceae）的相对丰度在经硅胶干燥后的根样品中的丰度几乎为零。在属水平上（图 1：c，表 1），管叶槽舌兰根内生真菌的相对丰度也发生了改变，青霉属（*Penicillium*）、*Aporospora*、瘤菌根菌属（*Epulorhiza*）经干燥后丰度降低，而枝孢属（*Cladosporium*）、镰

刀菌属（*Fusarium*）和 *Mycoacia* 在干燥后丰度明显升高，小脆柄菇属（*Psathyrella*）和刺盘孢属（*Colletotrichum*）的相对丰度经硅胶干燥后丰度为零。从排名前 15 的硅胶干燥处理前后管叶槽舌兰根部内生真菌属水平绝对丰度值变化表中可以看出青霉属、瘤菌根菌属、*Keissleriella* 及亚隔孢壳属（*Didymella*）在干燥后丰度值降低，其余属如：*Aporospora*、枝孢属、曲霉属（*Aspergillus*）、镰刀菌属、假裸囊菌属（*Pseudogymnoascus*）、红菇属（*Russula*）和链格孢属（*Alternaria*）等在干燥后丰度值增加，而小脆柄菇属和刺盘孢属在经硅胶干燥后的根部样品的丰度值为零，这与管叶槽舌兰根内生真菌在属水平的相对丰度变化趋势总体相似。

根据 OTUs 聚类结果（本文将未注释到的 OTU 包含在内一起计算，下同），绘制 OTUs 韦恩图（图 1：g），结果显示，新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌特有的 OTUs 有 56 个，主要是子囊菌门（16 个 OTUs）和担子菌门（12 个 OTUs）；而经硅胶干燥后根样中内生真菌有 123 个特有 OTUs，主要隶属于子囊菌门（47 个 OTUs），担子菌门仅有 10 个 OTUs；两个分组共有的 OTUs 仅有 61 个，其中有 21 个 OTUs 属于子囊菌门，8 个 OTUs 属于担子菌门。结果表明干燥后的管叶槽舌兰根样中内生真菌群落在丧失掉新鲜根样中的一些真菌类群的同时，也产生了相当数量的新的真菌类群，这些新产生的真菌主要隶属于子囊菌门。

在内生细菌方面，新鲜管叶槽舌兰根内生细菌注释到 15 门 105 科 178 属，其中变形菌门相对丰度 18.21%，蓝藻门（Cyanobacteria）相对丰度 1.78%，厚壁菌门相对丰度 1.41%，放线菌门（Actinobacteria）相对丰度 1.14%，拟杆菌门（Bacteroidetes）、螺旋体门（Spirochaetes）、酸杆菌门（Acidobacteria）、绿弯菌门（Chloroflexi）的相对丰度低于 1%；而经硅胶干燥后的管叶槽舌兰注释到的根内生细菌有 21 门 154 科 336 属，其中变形菌门相对丰度 48.71%，厚壁菌门（Firmicutes）相对丰度 8.31%，放线菌门相对丰度 5.67%，拟杆菌门（Bacteroidetes）相对丰度 3.41%，蓝藻门相对丰度 2.58%，螺旋体门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门（Nitrospirae）、绿弯菌门的相对丰度低于 1%（图 1：d）。在两个分组中变形菌门丰度均占绝对优势。相比较而言，干燥后管叶槽舌兰根样内生细菌类群数量也同样变多；经硅胶干燥后，占主要优势的变形菌门、厚壁菌门、放线菌门细菌相对丰度均有明显提高（图 1：d）。管叶槽舌兰根内生细菌经硅胶干燥后在科水平（图 1：e）的相对丰度也发生了改变，鞘脂单胞菌科（Sphingomonadaceae）、拜叶林克氏菌科（Beijerinckiaceae）、肠杆菌科（Enterobacteriaceae）、红杆菌科（Rhodobacteraceae）、黄色杆菌科（Xanthobacteraceae）、假单胞菌科（Pseudomonadaceae）、瘤胃菌科（Ruminococcaceae）、根瘤菌科（Rhizobiaceae）等占比均明显升高，而伯克氏菌科（Burkholderiaceae）在干燥后明显降低。在属水平上（图 1：f，表 1），管叶槽舌兰根内生细菌的相对丰度也发生了改变，鞘氨醇菌属（*Sphingomonas*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）、副球菌属（*Paracoccus*）和泛菌属（*Pantoea*）在干燥后丰度明显升高，而马赛菌属（*Massilia*）在干燥后明显降低。从排名前 15 的硅胶干燥处理前后管叶槽舌兰根内生细菌属水平绝对丰度值变化表中可以看出马赛菌属和 *Rubrobacter* 在干燥后丰度值降低，其余属如：鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、泛菌属和分支杆菌属（*Mycobacterium*）等经干燥后丰度值都明显增加，这与管叶槽舌兰根内生细菌在属水平的相对丰度变化趋势相似。

根据 OTUs 聚类结果，绘制 OTUs 韦恩图（图 1：h），结果显示，新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌特有的 OTUs 有 751 个，主要是蓝藻门（33 个 OTUs）；而经硅胶干燥后根样中内生细菌有 579 个特有 OTUs，主要隶属于厚壁菌门（100 个 OTUs）；两个分组共有的 OTUs 有 532 个，其中有 127 个 OTUs 属于变形菌门，50 个 OTUs 属于蓝藻门，36 个 OTUs 属于厚壁菌门，13 个 OTUs 属于拟杆菌门，1 个 OTUs 属于酸杆菌门，1 个 OTUs 属于螺旋体门。结果分析表明，相对于真菌来说，管叶槽舌兰拥有更为丰富的内生细菌类群，同内生真菌一样，经硅胶干燥后，其内生细菌群落在丧失掉新鲜根样中的一些细菌类群的同时，也

产生了相当数量的新的细菌类群，丧失的细菌主要隶属于蓝藻门，而新产生了大量的厚壁菌门。

a、**b**、**c** 分别为新鲜和干燥管叶槽舌兰根样内生真菌门、科、属水平相对丰度柱形图；**d**、**e**、**f** 分别为新鲜和干燥管叶槽舌兰根样内生细菌门、科、属水平相对丰度柱形图；**g**. 新鲜和干燥管叶槽舌兰根样内生真菌 OTUs 韦恩图；**h**. 新鲜和干燥管叶槽舌兰根样内生细菌 OTUs 韦恩图。

a, **b**, **c**. Histograms of relative abundance of endophytic fungi phylum, family and genus in the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum* respectively; **d**, **e**, **f**. Histograms of relative abundance of endophytic bacterial phylum, family and genus in the fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum* respectively; **g**. Venn diagrams of endophytic fungi OTUs in the fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum*; **h**. Venn diagrams of endophytic bacterial OTUs in the fresh and silica gel-dried roots of *H. kimballianum*.

图 1 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌物种相对丰度柱形图和韦恩图

Fig. 1 Column diagram of relative abundance and venn diagram of endophytes in the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

表 1 管叶槽舌兰根样 Top 15 内生菌属绝对丰度值经硅胶干燥处理前后的变化

Table 1 Changes of absolute abundance of the Top 15 endophytes genera in roots of *Holcoglossum kimballianum* before and after drying with silica gel

内生真菌 Endophytic fungi	新鲜根样组 MRHo.F	干燥根样组 MRHo.D	内生细菌 Endophytic bacteria	新鲜根样组 MRHo.F	干燥根样组 MRHo.D
青霉属 *Penicillium*	721.25	589.38	马赛菌属 *Massilia*	339.25	256.75
小脆柄菇属 *Psathyrella*	37	0	鞘氨醇菌属 *Sphingomonas*	159.88	2867.63
刺盘孢属 *Colletotrichum*	31.38	0	假单胞菌属 *Pseudomonas*	113	571.63
Aporospora	24	56.38	肠杆菌属 *Enterobacter*	60.63	79.88
瘤菌根菌属 *Epulorhiza*	20.63	6.5	蓝藻门 Cyanobacteria	58.13	38.38
Keissleriella	11.38	6.88	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	46.13	192.25
枝孢属 *Cladosporium*	3.38	170.25	泛菌属 *Pantoea*	45.63	422.63
曲霉属 *Aspergillus*	3.25	9.5	萨特氏菌属 *Sutterella*	40.5	42.75
镰刀菌属 *Fusarium*	2.5	77.13	甲基杆菌属 *Methylobacterium*	31.5	635.88

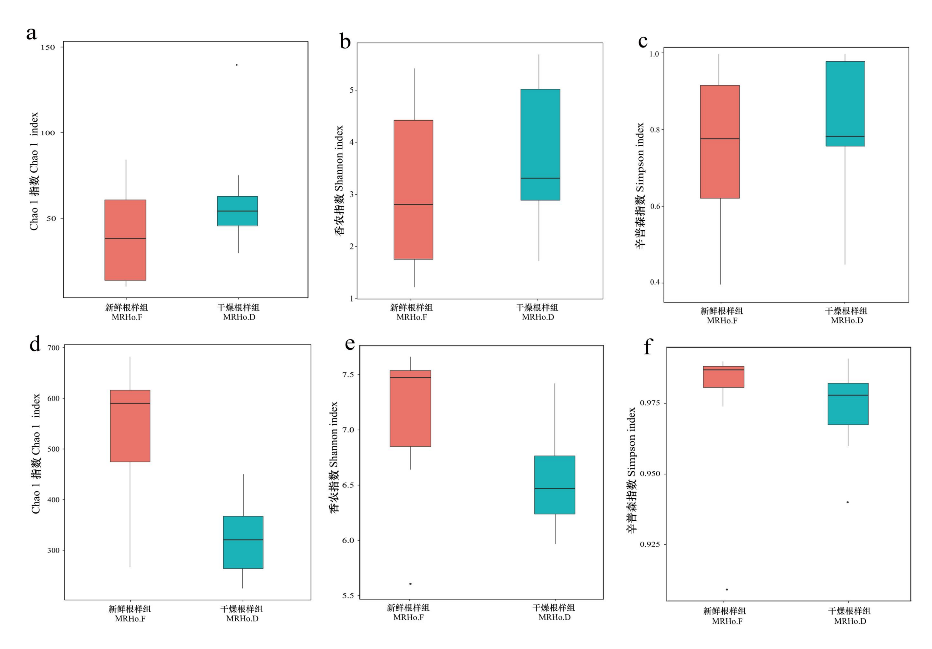
假裸囊菌属 *Pseudogymnoascus*	2.38	7.25	沙雷氏菌属 *Serratia*	27.63	178.25
红菇属 *Russula*	1.5	8.5	分支杆菌属 *Mycobacterium*	25.63	321.88
硬皮马勃属 *Scleroderma*	1.38	1.63	*Ilumatobacter*	18.5	71
链格孢属 *Alternaria*	1.38	3.75	根瘤菌科 Rhizobiaceae	14.88	359.38
Solicoccozyma	1.25	3.25	*Rubrobacter*	13.25	2.13
亚隔孢壳属 *Didymella*	1.25	0.63	葡萄球菌属 *Staphylococcus*	12.38	140.75

注：蓝藻门、肠杆菌科和根瘤菌科未鉴定到属。

Note: No genera were identified for Cyanobacteria, Enterobacteriaceae and Rhizobiaceae

2.2 内生菌群落多样性差异分析

为对比新鲜与干燥管叶槽舌兰根样中的内生菌群落的丰富度和多样性，对两组样品内生菌群落的α多样性进行比较分析，包括 Chao 1、Shannon、Simpson 等指数，Chao 1 是计算群落中含 OTU 数目的指数，常用来指示群落物种丰富度，Shannon 和 Simpson 是综合考虑样本中物种的丰富度与均匀度指数，用来表示群落多样性。经分析发现，新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的 Chao 1、Shannon、Simpson 指数分别为：39.797、3.07、0.723；硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落的 Chao 1、Shannon、Simpson 指数分别为：62.348、3.715、0.785。新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的 Chao 1 指数明显低于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落，新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落 Shannon、Simpson 指数略低于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落，水平相当。*T*-test 检验表明干燥前后三个α多样性指数均无显著性差异。结果表明硅胶干燥前后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落多样性水平相当，但干燥后物种数量明显变多。新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌群落的 Chao 1、Shannon、Simpson 指数分别为：524.492、7.103、0.976；硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落的 Chao 1、Shannon、Simpson 指数分别为：321.154、6.543、0.973。经硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落 Chao 1 指数远低于新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌群落。新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌群落 Shannon、Simpson 指数高于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落。*T*-test 检验表明干燥前后三个α多样性指数除了 Chao 1 指数（$P_{t\text{-test}}$=0.008）其他均无显著性差异。结果表明硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生细菌群落物种数量和多样性明显减少。这一结果与管叶槽舌兰根样的内生真菌群落的正好相反。



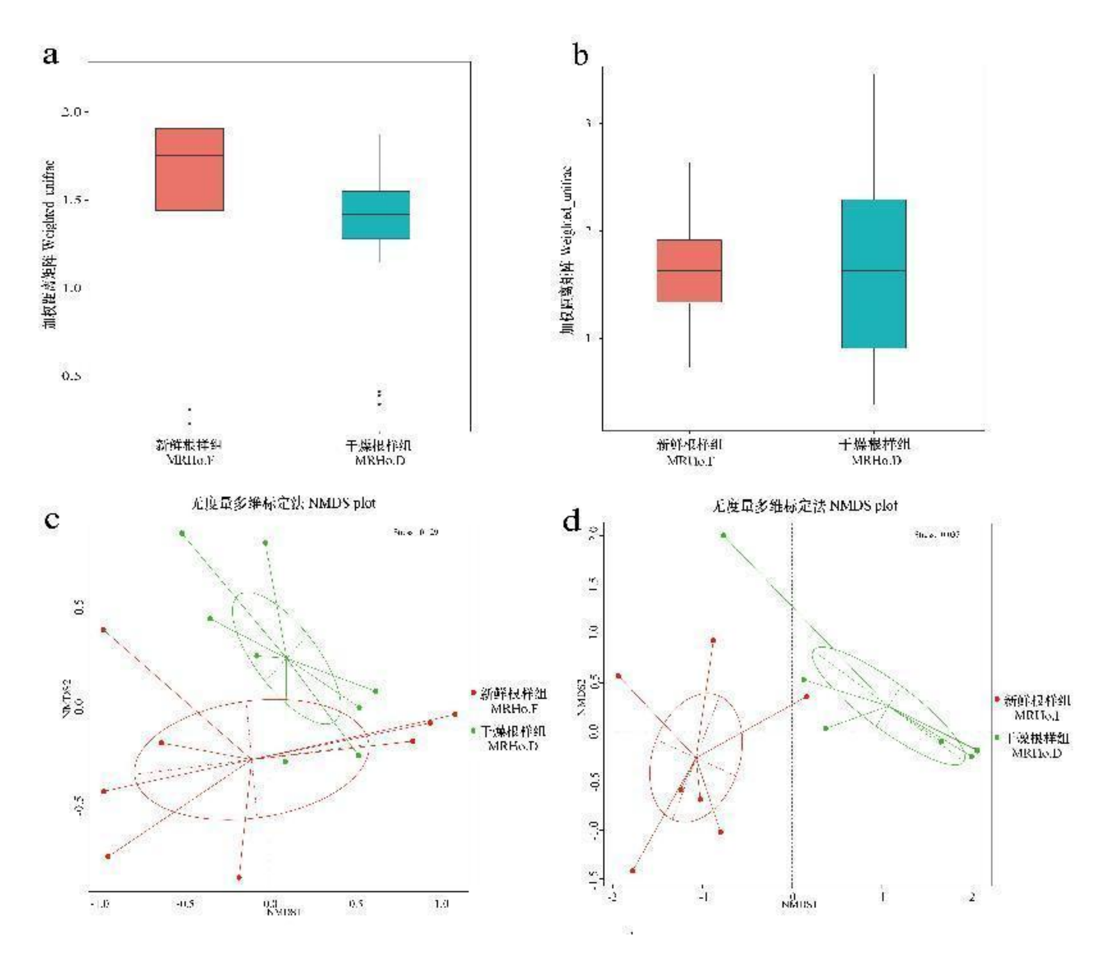
a、**d**. 管叶槽舌兰新鲜和干燥根样内生真菌（$P_{t\text{-test}}$=0.1981）、内生细菌（$P_{t\text{-test}}$=0.008）Chao 1 指数；**b**、**e**. 管叶槽舌兰新鲜和干燥根样内生真菌（$P_{t\text{-test}}$=0.4095）、内生细菌（$P_{t\text{-test}}$=0.09058）Shannon 指数；**c**、**f**. 管叶槽舌兰新鲜和干燥根样内生真菌（$P_{t\text{-test}}$=0.5462）、内生细菌（$P_{t\text{-test}}$=0.7866）Simpson 指数。

a, d. Endophytic fungi ($P_{t\text{-test}}$=0.1981), endophytic bacteria ($P_{t\text{-test}}$=0.008) Chao1 index in fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum Kimballianum*; **b, e**. Endophytic fungi ($P_{t\text{-test}}$=0.4095), endophytic bacteria ($P_{t\text{-test}}$=0.09058) Shannon index in fresh and silica gel-dried roots of *H. Kimballianum*; **c, f**. Endophytic fungi ($P_{t\text{-test}}$=0.5462), endophytic bacteria ($P_{t\text{-test}}$=0.7866) Simpson index in fresh and silica gel-dried roots of *H. Kimballianum*.

图 2 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌群落α多样性差异分析图

Fig. 2 Differences of alpha diversity indexes of endophyte communities between the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

为研究新鲜与干燥管叶槽舌兰根样中的内生菌群落的差异程度，对两组样品内生菌群落的β多样性进行比较分析。基于 Weighted Unifrac 的β多样性分析发现新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌的β多样性高于硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的β多样性，而内生细菌基于 Weighted Unifrac 的β多样性则发现硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中内生细菌群落的β多样性要高于新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌的β多样性，*T*-test 检验发现干燥前后β多样性指数亦无显著性差异。为进一步衡量硅胶干燥前后管叶槽舌兰根内生真菌与内生细菌群落间的差异，进行 NMDS 分析。基于 Weighted Unifrac 的 NMDS 分析发现，新鲜及干燥管叶槽舌兰根内生真菌与细菌群落具有明显分区。分析表明新鲜及干燥管叶槽舌兰根内生真菌与细菌群落的β多样性无显著性差异，然而在物种组成上具有明显不同。



a、**b**. 管叶槽舌兰新鲜和干燥根样内生真菌（$P_{t\text{-test}}$=0.074 24）、内生细菌（$P_{t\text{-test}}$=0.727 26）基于 Weighted Unifrac β多样性；**c**、**d**. 管叶槽舌兰新鲜和干燥根样内生真菌、内生细菌基于 Weighted Unifrac 距离的 NMDS 分析。

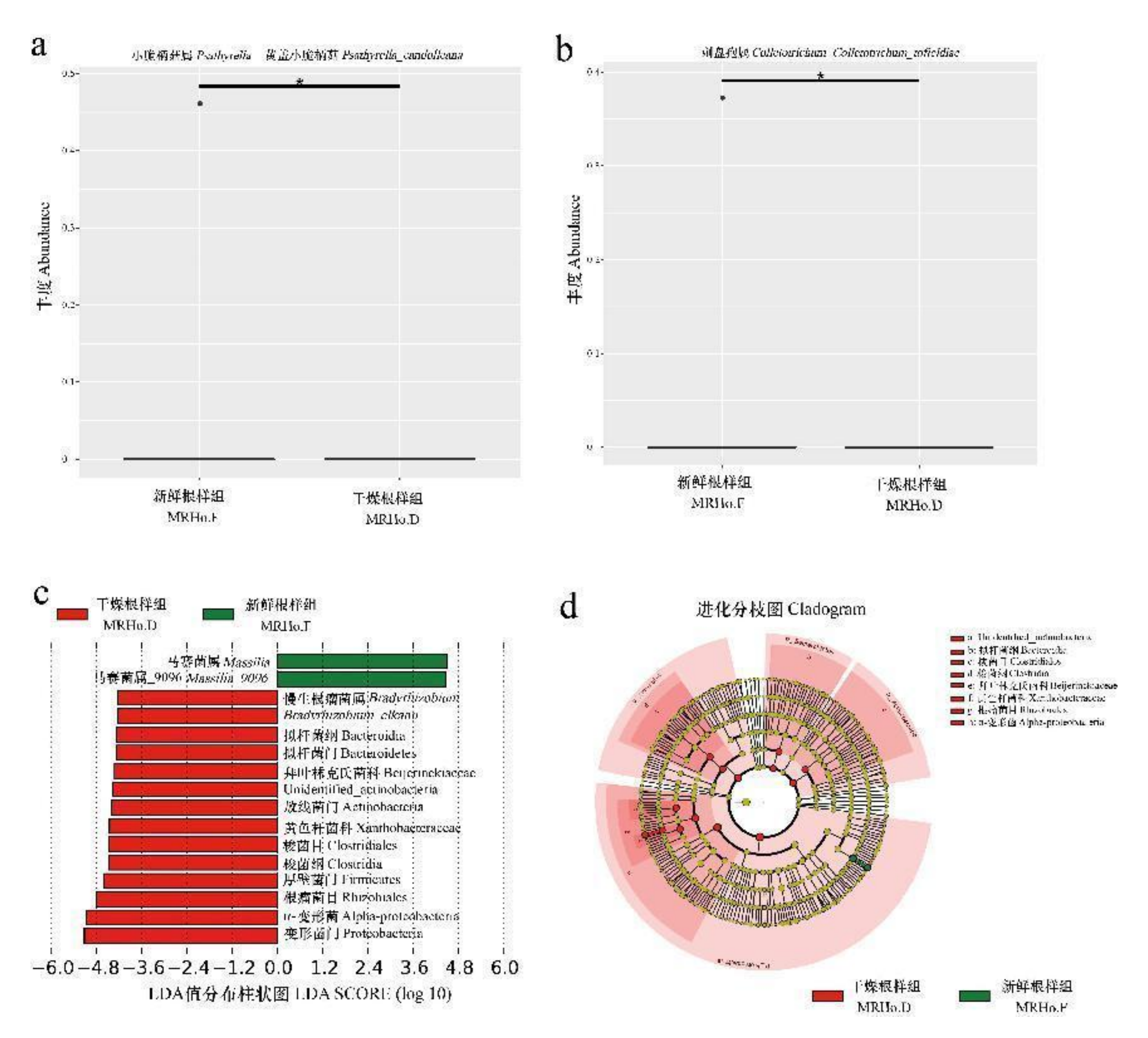
a, b. Endophytic fungi ($P_{t\text{-test}}$=0.074 24), endophytic bacteria ($P_{t\text{-test}}$=0.727 26) in fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum Kimballianum* based on Weighted Unifrac β diversity**;** **c, d**. NMDS analysis of endophytic fungi, endophytic bacteria in fresh and silica gel-dried roots of *H. Kimballianum* based on Weighted Unifrac distance.

图 3 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌群落β多样性差异分析图

Fig. 3 Differences of beta diversity indexes of endophyte communities between the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

2.3 差异显著性内生菌类群分析

为研究硅胶干燥前后管叶槽舌兰根样中内生真菌与细菌群落间是否具有显著性差异的物种，利用 Metastat 和 LEfSe 分析筛选具有显著性差异的物种，MetaStat 分析表明，硅胶干燥前后，管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的差异显著性真菌有：担子菌门小脆柄菇属的黄盖小脆柄菇（*Psathyrella candolleana*）及子囊菌门刺盘孢属的 *Colletotrichum tofieldiae*，这两个显著性差异物种只存在于新鲜管叶槽舌兰根样的内生真菌群落中（图 4：a、b，表 1），LEfSe 分析发现新鲜及干燥管叶槽舌兰根样均具有各自的差异显著性内生细菌类群。新鲜管叶槽舌兰根样的差异显著性内生细菌类群为马赛菌属。干燥管叶槽舌兰根样的差异显著性内生细菌类群较多，在科和属水平上有拜叶林克氏菌科、黄色杆菌科及慢生根瘤菌属（图 4：c、d）。



a、b. 基于 Metastat 分析的管叶槽舌兰根样干燥前后差异显著性内生真菌类群；c、d. 基于 LEfSe 分析的管叶槽舌兰根样干燥前后差异显著性内生细菌类群（c. LDA 值分布柱状图；d. 进化分支图）。

a, b. Significant differences in endophytic fungal taxa before and after drying of the root samples of *Holcoglossum kimballianum* based on Metastat analysis; **c, d.** Significant differences in endophytic bacterial taxa before and after drying of the root samples of *H. kimballianum* based on LEfSe analysis (**c.** LDA value distribution histogram; **d.** evolution-branch graph).

图 4 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌物种显著性差异统计图

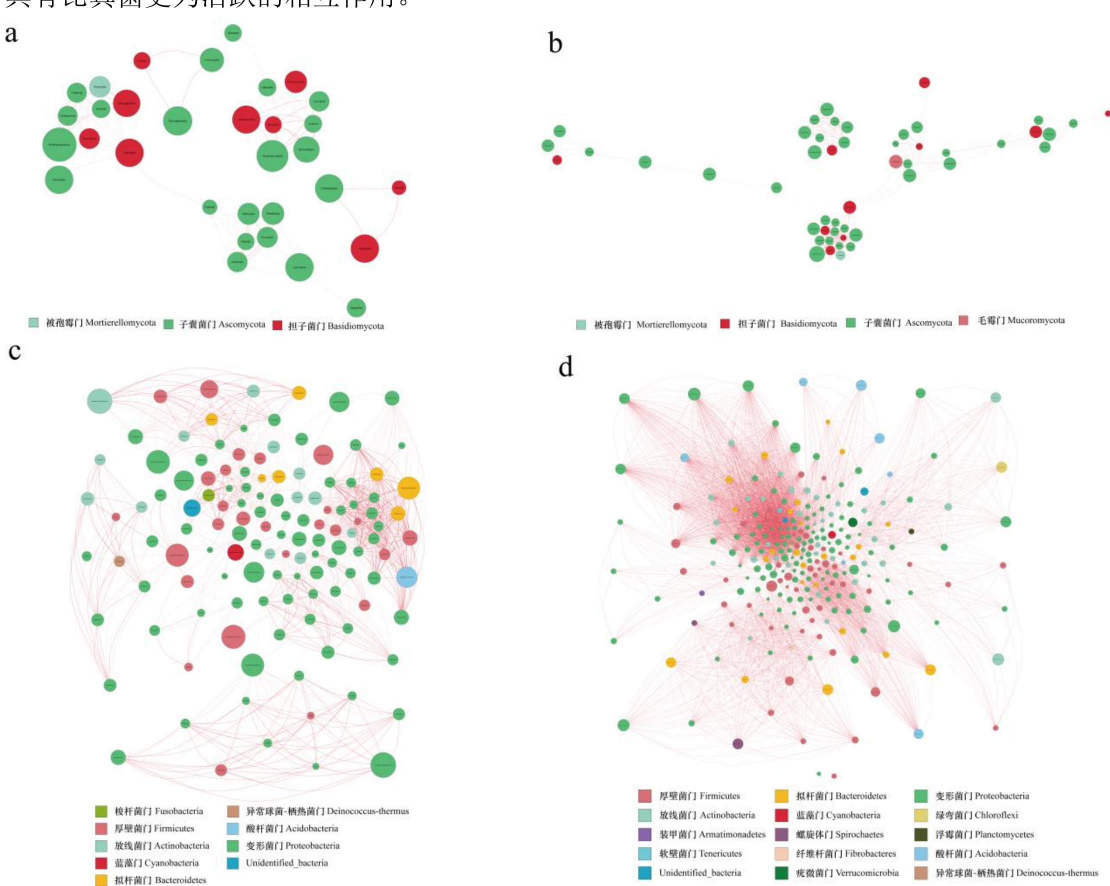
Fig. 4 Endophytic fungi and bacteria species with significant differences detected between the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

2.4 共发生网络（Co-occurrence Network）分析

物种共发生网络图可以直观的看出某个环境下占互作主导地位的优势物种、互作紧密的物种群，这些优势物种以及物种群往往对维持该环境的微生物群落结构和功能稳定发挥着独特以及重要的作用（Wen et al., 2020）。对新鲜管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落和硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落进行共发生网络分析，结果显示，新鲜管叶槽舌兰根样中内生真菌群落共发生网络中的物种主要分布在子囊菌门、担子菌门及 Mortierellomycota。其中，占互作主导地位的优势属主要有：瘤菌根菌属、假裸囊菌属（*Pseudogymnoascus*）、裂褶菌属（*Schizophyllum*）、假尾孢菌属（*Pseudocercospora*）、*Vishniacozyma* 及 *Aporospora* 等（图 5：a）。硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中内生真菌群落共发生网络中的物种则分布在子囊菌门、担子菌门、Mortierellomycot 和毛霉门。其中，占互

作主导地位的优势属主要有：*Vishniacozyma*、*Stephanonectria*、弯颈霉属（*Tolypocladium*）、小克银汉霉属（*Cunninghamella*）、*Archaeorhizomyces* 及假霉样真菌属（*Pseudallescheria*）等（图 5：b）。在内生细菌方面，新鲜管叶槽舌兰根样中内生细菌群落共发生网络中的物种主要分布在梭杆菌门（Fusobacteria）、厚壁菌门、放线菌门、蓝藻门、拟杆菌门、异常球菌-栖热菌门（Deinococcus-Thermus）、酸杆菌门和变形菌门。其中，占互作主导地位的优势属主要有：芽孢杆菌属、生丝微菌属（*Hyphomicrobium*）、不动杆菌（*Acinetobacter*）、梭杆菌属（*Fusobacterium*）、*Psychroglaciecola*、*Parabacteroides*、异常球菌属（*Deinococcus*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）等（图 5：c）。硅胶干燥后管叶槽舌兰根样中内生细菌群落共发生网络中的物种则分布在厚壁菌门、放线菌门、装甲菌门（Armatimonadetes）、软壁菌门（Tenericutes）、拟杆菌门、蓝藻门、螺旋体门、纤维杆菌门（Fibrobacteres）、变形菌门、绿弯菌门、浮霉菌门（Planctomycetes）、酸杆菌门和栖热菌门。其中，占互作主导地位的优势属主要有热解糖梭菌属（*Thermoanaerobacterium*）、*Mucilaginibacter*、微球菌属（*Micrococcus*）、异常球菌属、*Fimbriiglobus*、*Sphaerochaeta*（图 5：d）。

结果分析表明，同新鲜管叶槽舌兰根样中的内生菌群落相比，硅胶干燥后管叶槽舌兰根样的内生菌群落中占互作主导地位的优势物种、密切作用的菌类群、丰度及互作模式都发生了改变。同时，与内生真菌群落相比，无论是干燥前还是干燥后管叶槽舌兰根内生细菌共发生网络中密切互作的类群及节点均远远多于内生真菌群落，表明管叶槽舌兰根内生细菌群落具有比真菌更为活跃的相互作用。



a. 管叶槽舌兰新鲜根样内生真菌 Network 图；**b.** 管叶槽舌兰干燥根样内生真菌 Network 图；**c**. 管叶槽舌兰新鲜根样内生细菌 Network 图；**d.** 管叶槽舌兰干燥根样内生细菌 Network 图。

a. Network diagram of fresh roots endophytic fungi in *Holcoglossum kimballianum*; **b.** Network diagram of silica gel-dried roots endophytic fungi in *H.kimballianum*; **c.** Network diagram of fresh roots endophytic bacteria in *H.kimballianum*; **d.** Network diagram of silica gel-dried roots endophytic bacteria in *H. kimballianum*.

图 5 管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌群落共发生网络图
Fig. 5 Co-occurrence network diagram of endophyte communities detected in the fresh and silica gel-dried roots of *Holcoglossum kimballianum*

3 讨论与结论

3.1 管叶槽舌兰的菌根真菌与菌根细菌

管叶槽舌兰根内生真菌主要隶属于子囊菌门、担子菌门、球囊菌门、毛霉门和Mortierellomycota。这一结果与前人研究的兰科植物根内生真菌群落结构的分析结果相同（蒋玉玲等，2018；艾叶等，2019）。本研究发现新鲜管叶槽舌兰根样内占有较高丰度的曲霉科、小丛壳科和胶膜菌科，这三个真菌科被报道是兰科植物的菌根真菌科（Zelmer et al., 1996；Yuan et al., 2010），其中胶膜菌科是最常见的兰科植物菌根真菌科，与许多兰科植物形成广泛的菌根关系（Shao et al., 2020；Wang et al., 2022）。在属水平上，管叶槽舌兰根样内生真菌的优势属有青霉属、小脆柄菇属、刺盘孢属、*Aporospora* 和瘤菌根菌属，这些真菌类群均被报道是兰科植物的菌根真菌（王美娜等，2021）。李明等（2006）采用根组织切片法调查碧玉兰（*Cymbidium lowianum*）的菌根真菌，初步鉴定包括青霉属、链霉属等。Yamato 等（2005）对虎舌兰（*Epipogium roseum*）根内菌根真菌进行研究发现优势属为小脆柄菇属和鬼伞属（*Coprinus*）。Chen 等（2012）用分离培养和分子系统学方法对金钗石斛（*Dendrobium nobile*）和束花石斛（*D. chrysanthum*）根部内生真菌进行了研究，发现刺盘孢属是两种石斛属的优势属。有研究在金钗石斛、硬叶兜兰（*Paphiopedilum wardii*）和杏黄兜兰（*P. armeniacum*）根中都分离到瘤菌根菌属，并将其回接到三种兰科植物的组培苗中，发现瘤菌根菌属能够促进无菌苗的生长并且提高金钗石斛无菌苗的总生物碱和多糖的含量（陈晓梅等，2005；朱鑫敏等，2012）。Tan 等（2012）从九种野生槽舌兰属植物的根内生真菌中分离出 46 株可培养的内生真菌，隶属于 16 属，包括链格孢属、枝孢属、瘤菌根菌属、镰刀菌属、刺盘孢属、亚隔孢壳属、*Stephanonectria*、*Phomopsis*、拟隐孢壳 *Cryptosporiopsis*、*Leptosphaeria*、*Pyrenochaeta*、*Clonostachys*、*Cosmospora*、柱孢属 *Cylindrocarpon*、*Myrmecridium* 和 *Paraconiothyrium*，其中有九个属在本研究的管叶槽舌兰根样内生真菌中被注释到，表明该研究的管叶槽舌兰与同属植物中的内生真菌群落具有一定的相似性，瘤菌根菌属和镰刀菌属是九种野生槽舌兰属植物主要的内生真菌。推测这些真菌类群是对管叶槽舌兰有益的菌根真菌。

管叶槽舌兰根内生细菌主要隶属于变形菌门、蓝藻门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、螺旋体门、酸杆菌门和绿弯菌门。其中变形菌门、厚壁菌门、蓝藻门和放线菌门等是最为常见的兰科植物内生细菌门，变形菌门有利于生长素的合成（Tsavkelova et al., 2007a）。Tsavkelova 等（2003）在蝴蝶兰（*Phalaenopsis aphrodite*）、杓唇石斛（*D. Moschatum*）和短序脆兰（*Acampe papillosa*）中都分离出的兼顾固氮性和光合作用的蓝藻门，厚壁菌门中的芽孢杆菌属能防止叶斑病，促进种子的萌发和植株生长，减少幼苗坏死（White et al., 2014，程萍等，2008）。在蝴蝶兰（Girija et al., 2018）和铁皮石斛（Yu et al., 2013）中均有报道螺旋体门和绿弯菌门，但其丰度较低。本研究发现新鲜管叶槽舌兰根样内丰度较高的伯克氏菌科在干燥后的根样中丰度明显下降。Galdiano 等（2011）从 *Cattleya walkeriana* 中分离出的肠杆菌科和伯克氏菌科等细菌，发现它们能促进生长并提高植株的存活率。在属水平上，管叶槽舌兰根样内生细菌的优势属主要有马赛菌属、鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属和泛菌属，马赛菌属不仅能合成各种次级代谢产物和酶，而且还有溶磷、降解菲和耐受重金属等功能（Zheng et al., 2017；杨恩东等，2019）。鞘氨醇菌属、假单胞菌属和肠杆菌属是许多兰科植物的优势菌，Tsavkelova 等（2007）将杓唇石斛根部分离的鞘氨醇菌属接种于杓唇石

斛种子，发现鞘氨醇菌属极大提高了种子萌发率；鞘氨醇菌属还能固定氮，并增加幼苗的生长和生物量（Yang et al., 2014）。假单胞菌属被报道是 *Pterostylis vittata* 根系的优势属，可以产生激素来促进植物吸收营养物质（Wilkinson et al., 1989；黄腾飞，2012），并有助于真菌在植株根部的定殖，促进兰花菌根的形成（张萍和宋希强，2012）。童文君等（2014）对美花石斛（*D. loddigesii*）内生细菌进行分离鉴定，发现肠杆菌属为优势属。

综上所述，结合前人研究及本文结果，推测青霉属、小脆柄菇属、刺盘孢属和瘤菌根菌属等内生真菌是管叶槽舌兰的菌根真菌；而马赛菌属、鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属等可能是管叶槽舌兰的"菌根细菌"。这些优势菌群可能在管叶槽舌兰的种子萌发、生长发育过程中起着重要的作用，在今后的研究中，可重点关注这些内生菌类群分离培养，及其与管叶槽舌兰的互利共生机理研究。

3.2 管叶槽舌兰根内生菌类群与多样性水平

3.2.1 管叶槽舌兰根内生真菌类群与多样性水平

管叶槽舌兰的根样内生真菌中共得到 117 个 OTUs，Jacquemyn 等（2016）采用 454 测序平台对火烧兰属（*Epipactis*）三个物种根内真菌进行研究共得到 105 个 OTUs，三个物种 OTUs 范围在 42~58，OTUs 数量低于本研究管叶槽舌兰根内真菌 OTUs 的数量。Park 等（2018）基于 454 测序平台对虾脊兰属（*Calanthe*）6 个物种的根内真菌进行了研究，他们在每个样本中得到的 OTUs 数量范围为 22~57，也远低于本研究 OTUs 数量的水平。本研究中管叶槽舌兰根内真菌群落的α多样性指数 Chao 1 为 39.797，Shannon 为 3.07，Simpson 为 0.723。Zeng 等（2021）用 Illumina MiSeq 平台对白芨、黄花白芨（*B. ochracea*）和小白芨（*B. formosana*）三种白芨属植物的根内真菌研究发现，内生真菌群落的α多样性指数 Chao 1 分别为 94、73、39；Shannon 为 2.35、1.76、1.89；Simpson 为 0.26、0.32、0.30。本研究中的管叶槽舌兰根内真菌群落的 Shannon 和 Simpson 指数均高于三种白芨属兰科植物根内真菌群落的多样性水平，但是它们的 Chao 1 指数要比本研究的管叶槽舌兰根内真菌群落的 Chao 1 高。Tan 等（2012）基于分离培养和 ABI 3730 测序平台对九种野生槽舌兰属植物的根内生真菌研究发现，九种野生槽舌兰属植物的内生真菌 Shannon 多样性指数最高的是在短距槽舌兰（*H. flavescens*）中为 1.913，野生管叶槽舌兰 Shannon 多样性指数是 0.993 8，最低的是舌唇槽舌兰（*H. lingulatum*）为 0.950 3，本研究中的管叶槽舌兰根内真菌群落的 Shannon 指数均高于九种野生槽舌兰属植物根内真菌群落的多样性水平。分析表明，迁地保育状态的管叶槽舌兰有着与野生管叶槽舌兰和其他野生兰科植物相当的内生真菌数量或多样性水平。

3.2.2 管叶槽舌兰根内生细菌类群与多样性水平

管叶槽舌兰的根样中内生细菌共得到 1 283 个 OTUs、Chao 1 指数为 524.492、Shannon 指数为 7.103、Simpson 指数为 0.976，吴庆珊等（2018）从 3 个样地金钗石斛（*D. nobile*）的根茎叶中共分离出 1 082 株内生细菌，可分为 41 个 OTUs，共有 OTUs 有 14 个；陈泽斌等（2016）基于 16S 高通量测序从白芨中获得 48 个 OTU；数量远低于本研究管叶槽舌兰根内细菌 OTUs 的数量。Ou 等（2017）采用基于 16S rRNA 和 nifH 基因的元基因组焦磷酸测序技术，对中国 5 个地区的铁皮石斛相关菌群和重氮化菌群进行了研究，结果发现其 OTUs 范围在 597~3 023 之间，Shannon 指数范围在 4.35~6.49。相较而言，本研究所得到的管叶槽舌兰根内细菌 OTUs 的数量处于中间水平，Shannon 指数高于铁皮石斛的 Shannon 指数。谢泰祥等（2020）采用高通量测序技术分析福州鼓山野生建兰（*Cymbidium ensifolium*）根样内生细菌发现，建兰根内细菌群落的α多样性指数 Chao 1 为 700.99、Shannon 为 6.10、Simpson 为 0.95，本研究中的管叶槽舌兰根内细菌群落的 Chao 1 与野生建兰 Chao 1 相当，Shannon 及 Simpson 指数则是高于建兰的根内细菌群落。同样表明，迁地保育状态的管叶槽舌兰有着与其他野生兰科植物相媲美的内生细菌的丰富度和多样性水平。

3.3 新鲜样品与干燥样品对研究内生菌群落的影响

在处理微生物组样品时，如何减少从样品采集到预处理再到储存的过程中原始微生物群落的变化至关重要（Kim et al., 2017）。本研究对比了管叶槽舌兰新鲜与干燥根样中内生菌群落的变化。从新鲜管叶槽舌兰注释到根内生真菌有 6 门 46 科 51 属共 117 个 OTUs，注释到根内生细菌 15 门 105 科 178 属共 1 283 个 OTUs；而经硅胶干燥后的管叶槽舌兰注释到的根内生真菌有 6 门 88 科 116 属 184 个 OTUs，注释到根内生细菌 21 门 154 科 336 属共 1 111 个 OTUs，新鲜样品与干燥样品根部内生菌群落物种构成相差非常大。对管叶槽舌兰新鲜根样与干燥根样中内生菌群落进行α与β多样性、共发生网络等分析发现，与新鲜根样相比干燥后的管叶槽舌兰根内生菌群落的 OTUs 数量、物种类群及丰度、α多样性、β多样性及互作模式均发生了改变。

本研究还发现，在新鲜根样中的菌根真菌类群如小丛壳科和胶膜菌科，它们在干燥根样中的相对丰度几乎为零。在属水平上，青霉属、瘤菌根菌属、*Keissleriella* 及亚隔孢壳属在干燥后丰度值降低，而枝孢属、曲霉属、镰刀菌属、假裸囊菌属、红菇属和链格孢属等在干燥后丰度值增加。差异显著性物种分析也发现在两种采样处理中具有显著差异的担子菌门小脆柄菇属的黄盖小脆柄菇和子囊菌门刺盘孢属的 *Colletotrichum tofieldiae* 仅存在于新鲜管叶槽舌兰根样中的内生真菌群落。推测瘤菌根菌属、镰刀菌属、小脆柄菇属和刺盘孢属是管叶槽舌兰的益生真菌。管叶槽舌兰菌根真菌在干燥的根样中丰度下降或消失的原因可能是管叶槽舌兰的菌根真菌对宿主有一定的依赖性，健康生长的管叶槽舌兰可为其菌根真菌提供养分以供其生长，而当宿主死亡后，这些菌根真菌失去营养来源而逐渐死亡。

在内生细菌方面，马赛菌属和 *Rubrobacter* 在干燥后丰度值降低，而鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、泛菌属和分支杆菌属等经干燥后丰度值都明显增加。干燥管叶槽舌兰根样的差异显著性内生细菌类群较为丰富，有拜叶林克氏菌科、黄色杆菌科及慢生根瘤菌属。新鲜管叶槽舌兰细菌群落中差异显著性细菌类群是马赛菌属。推测马赛菌属、鞘氨醇菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、分支杆菌属及慢生根瘤菌属是管叶槽舌兰的益生细菌。干燥可能会引起细菌脱水，进而使细菌活力下降（Berninger et al., 2018；Majidzadeh et al., 2022）。Moreira 等（2021）对乳酸菌（LAB）培养物经过干燥处理，发现干燥会增加乳酸菌细胞的损伤，导致培养活力的丧失和细胞保护能力的改变。

综上结果表明，硅胶干燥的采样处理会显著改变内生菌群落 OTUs 数量、物种类群及丰度、α多样性、β多样性和互作模式，且会导致根内某些关键真菌及细菌类群尤其是菌根真菌和菌根细菌的丢失和变化，影响数据的完整性和准确性。因此，针对兰科植物根样内生菌的研究应使用新鲜的根样。

3.4 管叶槽舌兰根内生细菌和真菌的比较

本研究的管叶槽舌兰根样中内生真菌群落的 OTUs 有 117 个，Chao 1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数分别为 39.80、0.723 和 3.07。而内生细菌群落有 1 283 个 OTUs，Chao 1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数分别为 524.492、0.976 和 7.103。管叶槽舌兰根样内生细菌群落的丰富度和多样性要远比内生真菌群落的高，内生细菌可能有着远比已有认知对管叶槽舌兰更为重要的作用。兰科植物内生细菌与真菌的协作对宿主植物的生长具有重要意义（张芳芳等，2016），王小明等（2016）把铁皮石斛中分离得到的真菌和细菌进行组合，对铁皮石斛幼苗进行真菌+细菌联合接种，与未接种和单独接种处理相比，真菌+细菌组合对铁皮石斛幼苗生长的影响存在显著差异。张萍（2012）采用平板对峙法对铁皮石斛 6 株促生内生细菌与 8 株促生内生真菌进行了促生组合的研究，结果显示某些细菌与真菌组合后处理苗的各个指标均有所提高，与单一接菌的处理苗均形成显著性差异，特定的真菌或细菌组合表现出协同效应或累加效应。推测管叶槽舌兰根部真菌和细菌的相互作用可能共同影响管叶槽舌兰的生长发育，其相互作用的机制有待进一步研究和验证。

管叶槽舌兰作为一种珍稀濒危的兰科植物，根系内生菌在管叶槽舌兰种子萌发、幼苗形成、生长发育过程中起着重要的作用。本研究结果可为进一步采用菌根技术实现管叶槽舌兰种质保育提供理论基础，对管叶槽舌兰的保护与生产栽培具有重要意义，同时，也为兰科植物内生微生物的采样方法提供参考。

参考文献：

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, et al., 1990. Basic local alignment search tool[J]. J Mol Biol, 215(3): 403-410.

AI Y, XIE TX, LIU JF, et al., 2019. Community structure and biological function of the root symbiotic fungi of *Arundina graminifolia*[J]. Mycosystema, 38(10): 1631-1642.[艾叶，谢泰祥，刘江枫，等，2019. 竹叶兰根系共生真菌群落结构及生物学功能初探[J]. 菌物学报，38(10)：1631-1642.

BELLEMAIN E, CARLSEN T, BROCHMANN C, et al., 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi:anin silicoapproach reveals potential PCR biases[J]. Bmc Microbiol, 10(1): 189-200.

BERNINGER T, GONZALEZ LO, BEJARANO A, et al., 2018. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants[J]. Microb Biotechnol, 11(2): 277-301.

BOKULICH, NICHOLAS A, et al., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nat Methods, 10(1): 57-59.

CHEN YH, XING XK, GUO SX, 2017. Nutritional relationships between orchids and mycorrhizal fungi: a review[J]. Mycosystema, 36(7): 807-819. [陈艳红，邢晓科，郭顺星，2017. 兰科植物与菌根真菌的营养关系[J]. 菌物学报，36(7)：807-819.]

CHEN ZB, LI B, WANG DK, et al., 2016. Composition and diversity of endophytic bacteria in *Bletilla striata*[J]. J Southern Agric, 47(2): 227-233. [陈泽斌，李冰，王定康，等，2016. 白芨内生细菌组成及多样性分析[J]. 南方农业学报，47(2)：227-233.]

CHENG P, ZHENG YL, LI YJ, et al., 2008. Study on biocontrol of *Dendrobium* leaf spot caused by Fusarium[J]. Chin Agric Sci Bull, 24(9): 357-361. [程萍，郑燕玲，黎永坚，等，2008. 石斛兰镰刀菌叶斑病的生物防治研究[J]. 中国农学通报，24(9)：357-361.]

CHEN YL, YU LC, QIAN Y, et al., 2019. Isolation and identification of endophytic fungi and bacteria of *Phalaenopsis deliciosa*[J]. J Trop Biol, 10(4): 372-379. [陈耀丽，俞龙春，钱悦，等，2019. 大尖囊蝴蝶兰内生真菌和细菌的分离与鉴定[J]. 热带生物学报，10(4)：372-379.]

CHEN J, WANG H, GUO SX, 2012. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae)[J]. Mycorrhiza, 22(4): 297-307.

COMPANT S, SAMAD A, FAIST H, et al., 2019. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application[J]. J Adv Res, 19, 29-37.

CHEN XM, GUO SX, 2005. Effects of four endophytic fungi on the growth and polysaccharide and total alkaloid content of sterile seedlings of *Dendrobium nobile*[J]. Chin J Chin Mat Med, 30(4):14-18. [陈晓梅，郭顺星，2005. 4 种内生真菌对金钗石斛无菌苗生长及其多糖和总生物碱含量的影响[J]. 中国中药杂志，30(4)：14-18.]

EDGAR RC, 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nat Methods, 10(10): 996-998.

ESCUDERO MC, BULGARELLI D, 2019. Tracing the evolutionary routes of plant-microbiota

interactions[J]. Curr Opin Microbiol. 49, 34-40.
FARIA DC, DIAS ACF, MELO IS et al., 2013. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth[J].World J Microbiol Biotechnol, 29(2): 217-21.
GAI XG, XING XK, GUO SX, 2014. Ecological research of orchid mycorrhizae: a review [J]. Mycosystema, 33(4): 753-767. [盖雪鸽，邢晓科，郭顺星，2014．兰科菌根的生态学研究进展[J]．菌物学报，33(4)：753-767.]
GIRIJA D, RAJEEVAN PK, BALAKRISHNAN S, et al., 2018. 16S rRNA gene taxonomic profiling of endophytic bacteria associated with *Phylaenopsis* roots[J]. J Horticult Sci, 13(1): 103-107.
GAO Y, CHEN YH, XING XK, 2019. Symbiotic fungi inducing seed germination of medicinal *Gymnadenia conopsea* of Orchidaceae[J]. Mycosystema, 38(11):1948-1957.[高越，陈艳红，邢晓科，2019．兰科药用植物手参种子的真菌共生萌发[J]．菌物学报，38(11)：1948-1957.]
GALDIANO RF, PEDRINHO EAN, CASTELLANE TCL, et al., 2011. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization[J]. Rev Brasil De Ciência Do Solo. 35(3): 729-737.
HARRISON JG, FORISTER ML, PARCHMAN TL, et al., 2016. Vertical stratification of the foliar fungal community in the world's tallest trees[J]. Amer J Bot, 103(12): 2087-2095.
JACQUEMYN H, WAUD M, LIEVENS B, et al., 2016. Differences in mycorrhizal communities between *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and its presumed sister species *E. neerlandica*[J]. Ann Bot, 118(1): 105-114.
JIANG YL, MIAO Q, CHEN XH, et al., 2018. Root-associated fungi diversity of eight orchid species in Liaoning, China[J]. Chin J Ecol, 37(10): 3001-3009. [蒋玉玲，苗青，陈旭辉，等，2018．辽宁省八种兰科植物根内生真菌多样性[J]．生态学杂志，37(10): 3001-3009.]
KIM D, HOFSTAEDTER CE, ZHAO C, et al., 2017. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research[J]. Microbiome, 5(1): 52-66.
KÕLJALG U, NILSSON RH, ABAREBKOV K, et al., 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Mol Ecol, 22(21), 5271-5277.
KAUR J , SHARMA J, 2021. Orchid Root Associated Bacteria: Linchpins or Accessories?[J]. Front Plant Sci, 12: 661966.
LI TQ, YANG WK, WU SM et al. 2021. Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids[J]. Front Plant Sci, 12: 646325.
LI M, SHI JH, 2006. Investigations of Mycorrhizal fungi of *Cymbidium lowianum*[J]. Journal of Yunnan Normal University(Natural Sciences Edition), 26(3): 54-55. [李明，施继惠，2006．碧玉兰菌根真菌的调查[J]．云南师范大学学报(自然科学版)，26(3): 54-55.]
LOZUPONE CA, HAMADY M, KELLEY ST, et al. 2007. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 73(5): 1576-1585.
MCCORMICK MK, WHIGHAM DF, CANCHANI VA, 2018. Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics[J]. New phytol, 219(4): 1-9.
MOREIRA MTC, MARTINS E, PERRONE ÍT, et al., 2021. Challenges associated with spray drying of lactic acid bacteria: Understanding cell viability loss[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 20(4): 3267-3283.
MAGOČ T, SALZBERG SL, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 27(21): 2957-2963.

MAJIDZADEH HR, GHIASVAND M, REZAEI E, et al., 2022. Assessing the viability of three Lactobacillus bacterial species protected in the cryoprotectants containing whey and maltodextrin during freeze‐drying process[J]. Lett Appl Microbiol, 74(4): 505-512.

MARCHESI JR, RAVEL J, 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal[J]. Microbiome, 3: 31.

OKTALIRA FT, WHITEHEAD MR, LINDE CC, 2019. Mycorrhizal specificity in widespread and narrow-range distributed Caladenia orchid species[J]. Fungal Ecol, 42(C): e100869.

PARK MS, EIMES JA, OH SH, et al., 2018. Diversity of fungi associated with roots of *Calanthe* orchid species in Korea[J]. J Microbiol, 56(1): 49-55.

QIN JJ, LI YR, CAI ZM, et al., 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. Nature, 490(7418): 55-60.

RAHAYU ND, SUKARNO N, LISTIYOWATI S, et al., 2021. Flower endophytic fungi of geodorum densiflorum endangered orchid[C]//IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 948(1): 12037.

SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol, 12(6): 1-18.

SHAO SC, WANG QX, BENG KC, et al., 2020. Fungi isolated from host protocorms accelerate symbiotic seed germination in an endangered orchid species (*Dendrobium chrysotoxum*) from southern China[J]. Mycorrhiza, 30(4): 529-539.

SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, et al., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Appl & Environ Microbiol, 75(23): 7537.

TAN XM, CHEN XM, WANG CL, et al., 2012. Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China[J]. Curr Microbiol, 64(2): 140-147.

TARKKA MT, FREY-KLETT P, 2008. Mycorrhiza helper bacteria[C]//Varma A. Mycorrhiza. 3rd ed. Berlin: Springer: 113-132.

TSAVKELOVA EA, LOBAKOVA ES, KOLOMEITSEVA GL, et al., 2003. Associative cyanobacteria isolated from the roots of epiphytic orchids[J]. Microbiology, 72(1): 92-97.

TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, KLIMOVA SY, et al., 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin[J]. Arch Microbiol, 188(6): 655-664.

TONG WJ, ZHANG L, XUE QY, et al., 2014. Isolation of endophytic bacteria in *Dendrobium loddigesii* collected from different locations and comparison on their plant-growth-promoting potential[J]. J Plant Resour Environ, 23(1):16-23. [童文君，张礼，薛庆云，等，2014．不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较[J]．植物资源与环境学报，23(1)：16-23.]

WHITE JR, NAGARAJAN N, POP M, 2009. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples[J]. Plos Comput Biol, 5(4): e1000352.

WHITE JF, TORRES MS, SULLIVAN RF, et al., 2014. Occurrence of *Bacillus* amyloliquefaciens as a systemic endophyte of vanilla orchids[J]. Microsc Res Technique, 77(11): 874-885.

WEN T, ZHAO M, LIU T, et al., 2020. High abundance of Ralstonia solanacearum changed tomato rhizosphere microbiome and metabolome[J]. BMC Plant Biol, 20(1): 1-11.

WILKINSON KG, DIXON KW, SIVASITHAMPARAM K, 1989., Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids[J]. New

Phytol, 112(3): 429-435.
WU QS, Lei X, Lei YM, 2018. Analyses on composition and diversity of endophytic bacteria in *Dendrobium nobile*[J]. J Plant Resour Environ, 27(1): 79-90. [吴庆珊，雷珣，雷友梅，等，2018．金钗石斛内生细菌的组成及多样性分析[J]．植物资源与环境学报，27(1)：79-90.]
WANG XJ, WU YH, MING XJ, et al., 2021. Isolating ecological-specific fungi and creating fungus-seed bags for epiphytic orchid conservation[J]. Glob Ecol Conserv, 28: e01714.
WANG T, WANG XJ, GANG YQ, et al., 2022. Spatial pattern of endophytic fungi and the symbiotic germination of tulasnella fungi from wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) in China[J]. Curr Microbiol, 79(5): 139.
WANG MN, HU Y, LI HJ, et al., 2021. New insights into orchids mycorrhizal fungi research[J]. Guihaia, 41(4): 487-502. [王美娜，胡玥，李鹤娟，等，2021．兰科植物菌根真菌研究新见解[J]．广西植物，41(4)：487-502.]
XIE TX, ZHANG QH, ZHOU J, et al., 2020. Microbial communities in rhizosphere and root-endosphere of wild *Cymbidium ensifolium*[J]. Fujian J Agric Sci, 35(5): 560-568. [谢泰祥，张清华，周杰，等，2020．野生建兰根际与根内共生细菌种群结构差异分析[J]．福建农业学报，35(5)：560-568.]
YANG WK, 2020. Isolating effective fungi to facilitate seed germination of *Paphiopedilum spicerianum* and application in conservation practice[D]. Kunming: Yunnan University.[杨文科. 2020．促进白旗兜兰种子共生萌发有效真菌的分离与应用[D]．昆明：云南大学.]
YILMAZ P, PARFREYLW, YARZA P, et al., 2014. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks[J]. Nucl Acids Res, 42(D1): D643-D648.
YU J, ZHOU XF, YANG SJ, et al., 2013. Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE[J]. Appl Microbiol Biotech, 97(22): 9825-9836.
YUAN L, YANG ZL, LI SY, et al., 2010. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China[J]. Mycorrhiza, 20(8): 559-568.
YANG S, ZHANG X, CAO Z, et al., 2014. Growth-promoting Sphingomonas paucimobilis ZJSH 1 associated with *Dendrobium* officinale through phytohormone production and nitrogen fixation[J]. Microbial biotechnology, 7(6): 611-620.
YANG ED, CUI DX, WANG WY, 2019. Research progress on the genus *Massilia*[J]. Microbiol China. 46(6): 1537-1548. [杨恩东，崔丹曦，汪维云，2019．马赛菌属细菌研究进展[J]．微生物学通报，46(6)：1537-1548.]
ZHU XM, HU H, LI SY, et al., 2012. Interaction between Endophytic Fungi and Seedlings of Two Species of *Paphiopedilum* during Symbiotic Culture[J]. Plant Diversity, 34(2):171-178. [朱鑫敏，胡虹，李树云，等，2012．内生真菌与两种兜兰共培养过程中的相互作用[J]．植物分类与资源学报，34(2)：171-178.]
ZHANG FF, 2015. Screen and growth-promoting effect of endophytic bacteria from *Phalaenopsis pulcherrima* roots [D]. Haikou: Hainan University. [张芳芳，2015．五唇兰根部内生细菌筛选及其促生效应研究[D]．海口：海南大学.]
ZHANG FF, SONG ZQ, ZHU GP, 2016. Diversity of culturable endophytic bacteria isolated from the root tissues of *Phalaenopsis pulcherrima* in two different habitats [J]. Plant Sci J, 34(1):135-142. [张芳芳，宋希强，朱国鹏，2016．不同生境下五唇兰根部可培养内生细菌多样性研究[J]．植物科学学报，34(1)：135-142.]
ZHANG P, 2012. Study on endophytic bacteria of *Dendrobium catenatum* Lindley

(Orchidaceae)[D]. Haikou: Hainan University. [张萍，2012．铁皮石斛内生细菌研究[D]．海口：海南大学.]

ZHENG BX, BI QF, HAO XL, et al., 2017. *Massilia phosphatilytica* sp. nov., a phosphate solubilizing bacteria isolated from a long-term fertilized soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 67(8): 2514-2519.

ZHANG P, SONG XQ, 2012. Advances in diversity and promotion mechanism of endophytic bacteria associated with Orchids [J]. J Trop Subtrop Bot, 20(1):92-98. [张萍，宋希强，2012．兰科植物内生细菌物种多样性及其促生机理研究进展[J]．热带亚热带植物学报，20(1)：92-98.]

ZENG XH, NI ZY, DIAO HX, et al., 2021. Root Endophytic Fungal Community and Carbon and Nitrogen Stable Isotope Patterns Differ among *Bletilla* Species (Orchidaceae)[J]. J Fungi (Basel), 7(2): 69.

ZELMER CD, CUTHBERTSON L, CURRAH RS, 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms[J]. Mycoscience, 37(4): 439.